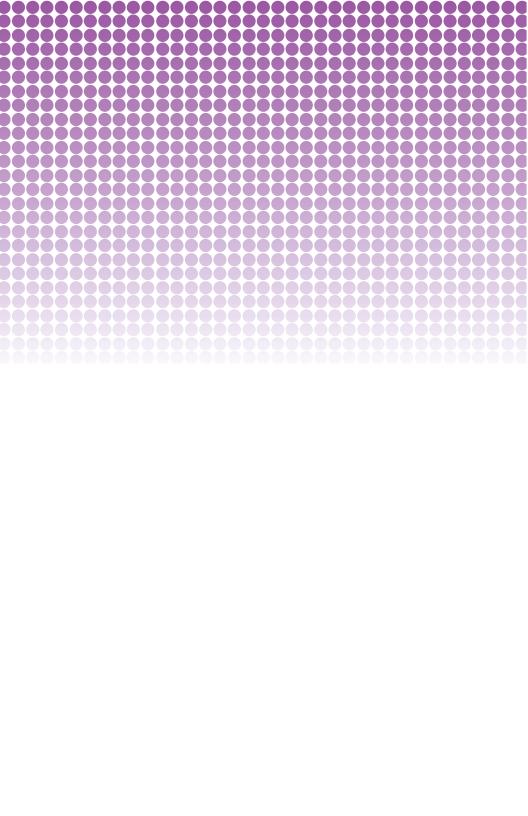


MANUAL DEL OPERADOR





Contenido

Información del Kit	4		
Introducción	. 4		
Contenido del Kit, Almacenamiento y Condiciones para Análisis.			
Principio	. 4		
Aplicabilidad	. 5		
Precauciones			
Preparación de la Muestra	6		
Procedimiento de Prueba Peel Plate EC	7		
Contador de Colonias para Peel Plate (Opcional):	. 9		
Control de Calidad	10		
Descarte	10		
Apoyo Técnico	10		
Información de Ordenes	10		
Garantía	11		

Información del Kit

Introducción

La prueba Peel Plate® EC ($E.\ coli$ y Coliformes) detecta y enumera coliformes totales incluyendo $E.\ coli$. El método es aplicable para la deteminación de coliformes totales, suma de coliformes y $E.\ coli$, en productos lácteos cuando son incubados a 32 \pm 1 °C. Este método distinguirá $E.\ coli$ en diluciones de alimentos, esponjas de superficie y muestras de agua, basados en el color de la colonia, cuando son incubadas a 35 \pm 1 °C. La muestra ó dilución de la muestra se agrega y se incuba por 24 \pm 2 horas, a 32 \pm 1 °C ó 35 \pm 1 °C dependiendo del tipo de alimento analizado y de los objetivos de detección microbiana. Las pruebas Peel Plate EC están diseñadas para laboratorios microbiológicos, pero tambien pueden ser utilizadas por los interesados en calidad de alimentos tales como agricultores, procesadores de leche y alimentos o en plantas procesadoras de agua de municipalidades. El límite de detección del método es 1 o más unidades formadoras de colonia por mililitro o gramo (UFC/mL ó gm) de muestra. El rango cuantitativo para coliformes incluyendo $E.\ coli$ se define como 1 a 154 UFC/prueba.

Contenido del Kit, Almacenamiento y Condiciones de Análisis

Cada kit (código PP-EC-100K) contiene 100 pruebas, dos bolsas de aluminio, cada una conteniendo 50 pruebas y un desecante azul. El kit para productos lácteos cultivados (código PP-ECS03-100K) contiene bisulfito de sodio concentrado para preparación de la muestra.

Los kits no necesitan ser refrigerados durante su envío.

Almacene en refrigeración los kits en la bolsa de aluminio hasta por 12 meses ó a temperatura ambiente hasta por 1 mes.

Abra la bolsa y remueva el número de placas necesarias para análisis. Para almacenar las pruebas sin usar, reselle la bolsa debidamente. Realice los análisis en un área seca a temperatura ambiente. Serán mas fáciles de abrir, placas mantenidas a temperatura ambiente por 1 hora ó más. Almacenamiento en húmedad o calor harán que las pruebas decoloren a amarillo. No use pruebas decoloradas o de bolsas que tengan desecante rosado/blanco.

Principio

El medio de la prueba Peel Plate EC está basado en el caldo EC para cultivar y diferenciar

colorimétricamente el crecimiento de coliformes y E. coli en muestras cultivadas a 35 \pm 1 °C. La prueba Peel Plate EC contiene el sustrato enzimático salmon-gal (6-cloro-3-indolyl-B-D-galactopiranosido) usado para detectar B-galactosidasa producida por coliformes y x-glucuronido (5-bromo-4cloro-3-indoil-B-D-glucuronido) usado para detectar B-glucuronidasa producida por E. coli cuando la muestra es incubada a 35 \pm 1 °C. La prueba Peel Plate EC también contiene agentes gelificantes y absorbentes que permiten absorber y difundir la muestra.

Aplicabilidad

La prueba Peel Plate EC ha sido certificada por el AOAC Research Institute como Performance Tested Method #061501. El rendimiento de este kit fue revisado por AOAC-RI y se encontró que cumple con las especificaciones del fabricante. El método ha sido validado para la detección de coliformes totales en productos lácteos líquidos (leche cruda y pasteurizada, descremada, chocolatada y crema), lácteos sólidos (leche descremada en polvo reconstituida, con lactosa reducida, helado de vainilla, crema agria, condensada/evaporada, de otros sabores y suero condensado), y productos lácteos cultivados previa homogenización en bisulfito de sodio antes de análisis (queso cottage, yogurt). No se encontró diferencia significativa al método de referencia de Agar Violet Red Bile (VRBA) con colonias confirmadas con Caldo Brilliant Green Lactose Bile (BGLB). At 35±1 °C, la prueba Peel Plate EC ha sido validada para distinguir coliformes y *E. coli* en carne molida, esponjas ambientales de superficie, esponjas y lavado de carcasas, aguas filtradas a 0.45 µm incluyendo agua para beber, agua de proceso de vegetales/frutas y no se encontró diferencia significativa en comparación con los métodos oficiales de referencia FDA-BAM ó US-FSIS ó EPA. Las muestras deben ser diluídas en serie a un rango contable de 1 a 154 UFC/ mL.

Precauciones

Siga Buenas Prácticas de Laboratorio al hacer análisis microbiológico. Evite contaminación de las muestras.

- Realice las pruebas con manos limpias y con guantes, asumiendo la posibilidad de bacterias patogénas.
- Haga los análisis en una superficie nivelada y limpia, libre de polvo o de corrientes de aire.
- Evite contacto con las muestras o con el medio en las placas Peel Plate EC.
- Después de agregar muestra, coloque la cubierta adhesiva, sin arrugas o dobleces para evitar que el medio rehidratado se seque durante el tiempo de incubación

Preparación de Muestra

Productos Lácteos Líquidos	Leche blanca (leche entera cruda o pasteurizada, baja en grasa y descremada) puede analizarse directamente o ser diluída en serie hasta un rango contable (1 a 154 UFC/mL).	
	 Para hacer diluciones en serie, agregue 11 mL en 99 mL de un búfer microbiologico apropiado. Otras opciones de dilución y pipetores de dilución son aceptables. 	
	 Leche chocolatada debe ser diluída 1 parte a 1 parte búfer dilución, y 1 mL plaqueado en dos placas en duplicado (total de 4 placas por muestra). Leche chocolatada también puede ser diluída en serie a un rango contable (1 a 154 UFC/mL) 	
Productos Lácteos Sólidos	 Agregue 11 g de producto sólido (helado, crema agria, heavy cream) a 99 mL de un búfer microbiologico apropiado para obtener un rango contable (1 a 154 UFC/mL). 	
	 Para productos lácteos sólidos fermentados (queso cottage, yogurt, suero condensado, etc.) que contiene cultivo activo de bacterias lácticas (LAB) 	
	 Agregue 11 g de producto a 99ml de diluyente y mezcle/ homogenice 	
	 Agregue 1 mL de solución de bisulfito de sodio (item BUF- NASO3 incluído en kit PP-ECSO3-100K) a la mezcla y mezcle. 	
	 Alternativamente disuelva 0.2 g de bisulfito de sodio en polvo en 99 ml de blanco de dilución, agregue 11 g producto y mezcle/homogenice. 	
	 Para leche en polvo y evaporada/condensada, reconstituya con agua estéril al contenido normal de sólidos y deje reposar. Analice como producto lácteo líquido. 	
Carne Molida	Agregue 50 g de carne molida a 450 mL de un búfer microbiologico apropiado y licúe con un "stomacher", deje reposar para extraer muestra.	
	Continue diluyendo 10 mL de la dilución previa en 90 mL de solución de dilución hasta un rango contable (1 a 154 CFU/mL).	
Huevos Líquidos	Agregue 100 ml de huevo líquido a 900 mL de un búfer microbiologico apropiado y licúe con un "stomacher", deje reposar para extraer muestra.	
	Continue diluyendo 10 mL de la dilución previa en 90 mL de solución de dilución hasta un rango contable (1 a 154 CFU/mL).	
Hisopo de Carcasas	Consulte el Adendo de Preparación de Muestras para Peel Plate.	
Hisopo Ambiental	Consulte el Adendo de Preparación de Muestras para Peel Plate.	
Agua Embotellada y Filtrada	• Consulte el Adendo de Preparación de Muestras para Peel Plate.	

Procedimiento para Prueba Peel Plate EC



Paso 1

 Identifique la placa en el lado claro usando un marcador o una tira de código de barras. No marque o identifique la placa dentro del área circular de 47 mm.



Paso 2

- Invierta y aplique presión con los dedos en la plataforma trasera (como en la foto) y levante la tapa adhesiva.
- Levante la cubierta adhesiva completamente hasta exponer el disco de cultivo. Deje la parte posterior adherida a la parte posterior de la placa.



Paso 3

 Manteniendo la cubierta levantada y la placa en una superficie plana, dispense verticalmente
 1.0 mL de muestra en el centro del disco.
 Deposite muestra en 2 a 3 segundos y a 1-2 cm arriba de la superficie.



Paso 4

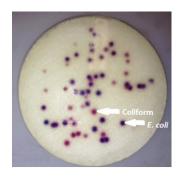
- La muestra se difundirá a los bordes del disco.
- Re-aplique la cubierta adhesiva evitando dobleces o arrugas. Presione alrededor en la orilla para asegurarse de sellado apropiado.



Paso 5

- Incube las placas con la parte clara hacia arriba, como se muestra.
- Incube a 32 ± 1 °C por 24 ± 2 horas para leche y productos lácticos. Incube 24 horas adicionales cuando analice yogurt.
- Incube a 35 ± 1 °C por 24 ± 2 horas para agua, muestras ambientales y de carne.
- Las placas pueden colocarse una sobre otra alineando las protuberancias y la plataforma rectangular. Esta configuración no afecta la transferencia de calor.

Análisis de Resultados



Colonias de Coliformes (rojas) = 20 E. coli (azul/negro) = 34 Coliformes Totales = 54 = 20 + 34

- Al final del período de incubación, observe las colonias través del lado claro de la placa. Cada punto coloreado, azul y rojo representa 1 UFC de coliformes. La suma de estos puntos se reporta como el UFC de coliformes totales/ml de la muestra diluída.
- Multiplique las UFC/mL por la dilución para calcular UFC/(mL ó g) en la muestra original. En el caso de leche chocolatada, sume las dos placas del producto diluído para un conteo de UFC/ mL de producto original.
- *E. coli* es un miembro del grupo coliformes y se diferencia colorimétricamente por colonias color azul, púrpura o verdoso a 35 ± 1 °C (ver Interpretación de Resultados). Los Coliformes serán color rojo (salmon)(ver Interpretación de Resultados). El conteo de las colonias rojas se reporta como coliformes y el conteo de colonias azul/púrpura/verde/negro se reportan como *E. coli*. La suma de las colonias es el conteo de coliformes totales (ver Interpretación de Resultados).
- En caso de bacterias propagándose por la caja, marque una UFC por cada punto definido.

Colonias mezcladas o propagadas se anotan como una UFC.

- Conteos de 1 a 154 UFC/placa se consideran contables. Resultados fuera de este rango son considerados estimaciones. Muestras fuera del rango contable deben ser diluídas y reanalizadas.
- Resultados Muy Numerosas para Contar (MNPC ó en Inglés: TNTC) pueden ser estimados contando colonias en un 1 centimetro cuadrado representativo, ó tomando el promedio de 5 cm² y multiplicando por 17.4 para un estimado de colonias por placa (eUFC/placa.
- Muestras de productos cultivados conteniendo LAB activo, e.g. yogurts, pueden presentar un fondo rojizo y requieren incubación adicional de 24 horas. Las colonias distintivas rojo oscuro deben contarse como coliformes.

Contador de Colonias para Peel Plate (Opcional):

- Luego de incubación, inserte la prueba en el Contador de Colonias de Peel Plate.
 Seleccione "Peel Plate EC"
- Entre la identificación o verifique el código de barras producido.
- Presione COUNT y UFC/mL Coliformes aparecerá en pantalla y será almacenado en la memoria incluyendo hora/fecha. Para mayor información, consulte las instrucciones del Contador de Colonias para Peel Plate.

Interpretación de Resultados

- En estudios de inclusividad y exclusividad con la Peel Plate EC y con Peel Plate CC, 57 de 58 aislamientos de coliformes de inclusividad fueron detectados correctamente como coliformes, incluyendo las 17 cepas de *E. coli*. La cepa no detectada fue *Escherichia blattae*, ATCC 29907. Seis de los 17 aislamientos de *E. coli* produjeron colonias rojas en lugar de las típicas colonias azul/púrpura/verde. Esto puede ser debido a que son productores débiles o no producen glucuronidasa que es producida por la mayoria de cepas genéricas de *E. coli*. Dos de éstas cepas, 0157:H7 y 0145, son *E. coli* tipo shiga, conocidos por no producir enzima. De las 32 cepas de exclusividad evaluadas, 31 fueron correctamente excluídas. La cepa detectada como coliforme fue Shigella sonnei, ATCC 9290. Incubación de productos lácteos a 32 ± 1 °C no induce de forma fiable la enzima β-glucuronidase en todas las cepas de *E. coli* y pueden producir color rojo solamente. La ausencia de colonias azules no debe ser interpretado como ausencia de *E. coli*.
- Peel Plate EC se ha evaluado en los productos descritos, pero no ha sido evaluada en todos lo productos, procesos o protocolos posibles, ni con todas las cepas posibles.
- Se ha evaluado agua embotellada, pero el método no ha sido evaluado para agua municipal de acuerdo con la Regla de Coliformes Totales de la EPA.

Control de Calidad

El control de calidad debe ser realizado de acuerdo a Buenas Practicas de Laboratorio y con la frecuencia determinada por procedimientos estándar de operación de laboratorio. Una práctica común es usar Control de Dilución, Control Negativo y Control Positivo.

- **Control de Dilución**: Analice 1.0 mL de bufer de dilución estéril para verificar la ausencia de bacterias luego del periodo de incubación.
- **Control Negativo:** Prepare Control Negativo autoclaveando la dilución apropriada de muestra a 121°C por 15 minutos. Enfrie a 4°C y analice 1.0 mL para verificar la ausencia de coliformes en el Control Negativo.
- Control Positivo: Contamine una muestra con un cultivo conocido o una combinación de coliformes y E. coli. Diluya la muestra a un rango de 1 a 154 UFC/mL y analice 1.0 mL para verificar detección después de la incubación.

Descarte

os cultivos microbiológicos y reactivos deben ser colectados en bolsas de riesgo biológico y esterilizados en el autoclave. Deseche de acuerdo a las regulaciones locales, estatales y federales.

Apoyo Técnico

Si tiene preguntas contacte su representate local o Charm Sciences al **+1.978.687.9200 ó support@charm.com.**

Información de Ordenes

Descripción	Cantidad	Código del Kit
Peel Plate EC	100	PP-EC-100K
	1000	PP-EC-1000K
Peel Plate EC incluyendo bisulfito de sodio concentrado	100	PP-ECSO3-100K
Bisulfito de sodio concentrado	1	BUF-NASO3

Hay disponibilidad de Pruebas Peel Plate de Alto Volumen para coliformes, bacterias aeróbicas, coliformes totales, enterobacteriaceae, levaduras y mohos y bacterias heterotróficas. Visite el sitio web de Charm Sciences en www.charm.com por más detalles.

Garantía

Charm Sciences, Inc ("Charm") garantiza que todos los productos reactivos, incluyendo pero sin limitación a los kits para pruebas, están libres de defectos por materiales y mano de obra y no tienen desviaciones de las especificaciones y descripciones de los productos reactivos Charm que aparecen en la documentación de producto Charm, siempre y cuando se almacenen en las condiciones adecuadas y se les de el uso normal y adecuado para cual fue previsto, hasta la fecha de vencimiento del periodo de conservación del producto reactivo, o si no se especifica, durante un año posterior a la fecha de entrega de dicho producto reactivo al comprador de consumo final. ESTA GARANTÍA SUSTITUYE TODAS LAS DEMÁS GARANTÍAS, YA SEAN ESTATUTARIAS, EXPRESAS O IMPLÍCITAS (INCLUYENDO LAS GARANTÍAS DE TÍTULO, NO INFRACCIÓN, COMERCIABILIDAD E IDONEIDAD PARA UN PROPÓSITO EN PARTICULAR Y TODAS LAS DEMÁS GARANTÍAS QUE SURJAN DE CURSO POR MANEJO O USO DE COMERCIO). La garantía que se suministra no puede ser alterada excepto mediante expreso consentimiento por escrito y firmado por un funcionario de Charm. Las interpretaciones, orales o escritas que no son coherentes con esta garantía no se han autorizando, y si se proporcionan, no son válidas. En caso de violación de esta garantía, la única obligación de Charm será reemplazar el producto reactivo o la parte de este, que se compruebe defectuoso por materiales o mano de obra, dentro del periodo de garantía, siempre y cuando el cliente notifique a Charm rápidamente de dicho defecto antes del vencimiento del periodo de garantía establecido. La única compensación que se proporciona por la presente no debe interpretarse como omisión de su propósito esencial mientras que Charm esté dispuesta a reemplazar cualquier producto o parte reactiva. Charm no tendrá responsabilidad por daños consecuentes, incidentales ni daño indirecto alguno que resulte en pérdidas económicas o a la propiedad causado a unos clientes debidas al uso de los productos reactivos. Excepto por la obligación de Charm establecida anteriormente, de reemplazar el producto reactivo que se compruebe defectuoso dentro del periodo de garantía, Charm no tendrá responsabilidad por daños de ningún tipo que surjan de o sean causados por resultados incorrectos o equivocados de pruebas obtenidas al usar dichos productos reactivos, sean o no causados por defectos en el producto reactivo.

OM-702-001



